

Всероссийский конкурс учебно-исследовательских работ
старшеклассников по политехническим, естественным,
математическим дисциплинам для учащихся 9-11 классов

Направление: химия

«Очистка хозяйственных и сточных вод от азота аммонийного с
помощью нитрифицирующих бактерий»

Черемных Павел Иванович.

11 класс. Лицей №1. г.Пермь.

Лариса Сергеевна Пан.

Преподаватель химии и биотехнологии, доцент

Пермь.2018.

Introduction

Receiving of nitrifying microorganisms and their use to wastewater treatment

Nowadays ammonium nitrogen removing from natural and sewage water remains one of the most serious problems. Lack of the effective solution of this problem negatively influences the water resource ecology. Insufficiently purified or purified at all sewage water is the main source of the ammonium nitrogen in natural water springs. Such water contains the ammonium nitrogen concentration higher than MPC. The increase of ammonium containing compounds concentration is being monitored now. In natural water springs the content of nitrogen is sometimes higher than 10-15 MPC. According to the existing standards, the concentration of the ammonium-ions in wastewater should not be higher than 15mg/l. If the ammonium nitrogen concentration is higher than MPC, it causes the seaweeds growth and the process of reservoir eutrophication (when lakes, ponds and rivers are overgrown). The application of the existing methods of purification and processing of ammonium containing sewage waters is limited because of their high cost and inefficiency.

One of the modern methods of water purification from ammonium nitrogen is microbiological method of purification that provides the optimal level of water quality. During biological water treatment ammonium is subjected to the action of microorganisms - nitrifiers. These microorganisms consequently oxidize ammonium to nitrites and nitrates under aerobic condition.

In this paper the method of removing ammonium nitrogen during biological purification of household sewage water is considered.

The tasks of research included:

1. studying of microorganism growth conditions
2. studying of the possibility of microorganisms to oxidize ammonium nitrogen;
3. studying of biological methods of water treatment with the help of the grown microorganisms.

The methods used:

1. method of determination of ammonium nitrogen concentration in sewage water;
2. photometric determination of nitrite-ions;
3. colorimetric determination of nitrate-ions;
4. method of getting the microorganisms on the nutrition environment;
5. disc-diffusion method;
6. method of studying of microorganisms growth in liquid environment and sorption some element/matter.

The sewage water from and soil from Perm were taken as inoculums for cultivating nitrification microorganisms. The cultivation was carried out in Vinogradskii environment (100cm³) in Erlenmeyer flasks (250 cm³) that were put into shaker for seven days. Two types of nitrification microorganisms were grown. They differ from each other in morphological signs. Tolerance of the grown microorganisms to ammonium cations has been defined by the disk-diffusion method. It is shown that the examined types of microorganisms don't experience oppression over 100 mg/l concentration of ammonium nitrogen.

Finally, during the research, we can make a conclusion that nitrifying microorganisms use ammonium nitrogen to oxidize it to nitrite-ions and nitrate-ions as well as a source of nutrients.

Оглавление

Введение

1.1 Методы удаления аммонийного азота из сточных вод

1.1.1 Метод хлорирования

1.1.2 Метод обратного осмоса

1.1.3 Метод отдувки аммиака

1.1.4 Ионный обмен

1.1.5 Электрохимический метод

1.2 Последствия употребления загрязненной аммонием воды

1.3 Последствия употребления нитритов и нитратов

1.4 Биологическая очистка сточных вод

1.5 Процессы нитрификации микроорганизмами. Окисление аммиака и нитрита

2. Теоретический анализ

3. Цели и задачи исследования

4. Методы исследования

4.1 Методика определения концентрации азота аммонийного в растворе

4.2 Фотометрическое определение нитритов с реактивом Грисса

4.3 Колориметрическое определение нитратов с применением салицилата натрия

4.4 Метод выделения и роста микроорганизмов

4.4.1 Приготовление жидкой питательной среды

4.4.2 Культивирование микроорганизмов

4.4.3 Посев на питательную среду и питательную среду и получение чистой культуры

4.4.4 Диска - диффузионный метод

4.4.5 Метод изучения роста культуры в жидкой питательной среде

5. Экспериментальная часть

5.1 Выделение микроорганизмов из почвы и воды

5.2 Выделение чистой культуры

5.3 Идентификация микроорганизмов

5.4 Проверка выделенных микроорганизмов на толерантность диско -
диффузионным методом

5.5 Испытание выделенных микроорганизмов в процессе нитрификации

6. Выводы и список литературы

Введение

Природная вода содержит различные органические вещества и биологические загрязнения. Они придают ей цветность, запах, привкус, служат источниками загрязнения болезнетворными микроорганизмами. В воде также содержатся в виде раствора катионы тяжелых металлов низшей валентности например железо и марганец, анионы в высшей в высшей валентности и растворенные газы, например, гидросульфаты и сероводород.

Россия обладает уникальным потенциалом водных ресурсов, поскольку ей принадлежит более 1/5 общемировых запасов питьевой воды. Это не только определяет особое место в мире, но и налагает особую ответственность за использование и охрану водных ресурсов.

В последние годы серьёзную угрозу для водных объектов представляют процессы эвтрофикации. В результате избыточного поступления с водосборных площадей биогенных веществ происходит ухудшение качества природных вод, которое, как правило, сопровождается изменением состояния структуры экосистем водных объектов.

Повышенная концентрация биогенных веществ приводит к бурному развитию сине-зеленых водорослей, снижению растворенного кислорода, заморам рыбы, зарастанию береговых зон, усложнению водоподготовки.

Ухудшение качества воды водных объектов напрямую связано с развитием процессов антропогенного эвтрофирования. Для решения этой сложной проблемы необходимо максимально снизить сброс в водные объекты биогенные вещества - соединения азота.

Городские сточные воды являются одним из основных источников поступления биогенных элементов в водоёмы. Несмотря на многочисленные отечественные разработки и успешную реализацию разноплановых систем и технологий очистки сточных вод, организацию масштабного отечественного и зарубежного производства современного и высокоэффективного оборудования, сбросы загрязняющих веществ в водоемы, а также попадание их в подземные воды со сточными водами продолжают и являются экологически небезопасными. Водные объекты большинства регионов России с учетом фактически запущенного и неудовлетворительного состояния очистных сооружений больших и малых городов представляют угрозу здоровью и безопасности населения. В настоящее время учёные всего мира уделяют большое внимание разработке новых и усовершенствованию существующих методов очистки сточных вод от биогенных элементов.

Метод биологической очистки сточных вод продолжает оставаться основным для очистки бытовых и близких к ним по составу производственных сточных вод. Традиционные технологии биологической очистки в аэротентах или на биофильтрах не обеспечивают предъявляемых к качеству очищенных сточных вод требований. Это вызывает необходимость введения дорогостоящих дополнительных стадий глубокой доочистки биологически очищенных сточных вод, стоимость которых 40% стоимости всего комплекса очистных сооружений.

На большинстве действующих очистных сооружений в Российской Федерации используют технологические схемы полной биологической очистки, которые включают сооружения, как правило, механической доочистки на фильтрах, но не обеспечивают эффективного удаления соединений азота до современных нормативных требований к сбросу очищенных стоков в водоемы. Например, удаление аммонийного азота из сточных вод на таких очистных сооружениях составляет 20 - 40%. Состояние биологических очистных сооружений водоотведения требует применения новых современных технологий очистки сточных вод с целью достижения глубокой очистки сточных вод не только на стадии доочистки, но и в процессе самой биологической очистки. Конечным результатом этого является улучшение показателей сточных вод, сбрасываемых после очистных сооружений в водоёмы.

1.1 Методы удаления азота аммонийного

Для удаления аммонийного азота из сточных вод существует ряд способов, как физико-химических, так и биологических. Но все они или требуют больших материальных вложений и сложны в эксплуатации или не обеспечивают глубокого удаления азота аммонийных солей.

1.1.1 Одним из методов физико-химического удаления азота из сточных вод является *хлорирование*. Весовые отношения хлора к азоту аммиака, требуемые для хлорирования сточных вод до точки перегиба, колеблются от 8:1 до 10:1; меньше значение применимо для сточных вод, прошедших обширную предварительную обработку. Хлорирование до точки перегиба при рН в диапазоне 6,5-7,5 может дать 95%-ное удаление аммиака, а при первоначальных концентрациях азота аммиака 8-15 мг/л содержание остаточных треххлористых азотистых соединений никогда не превышает 0,5 мг/л. Недостаток чрезмерного хлорирования состоит в том, что почти весь вводимый хлор восстанавливается в ионы хлорида, что приводит к повышению концентрации растворенных солей в очищенной сточной воде.

1.1.2 *Метод обратного осмоса*. Применение полупроницаемых мембран, в частности целлюлозоацетатных, позволяет достигать эффекта очистки от азотосодержащих соединений до 98,5%. Но процесс, основанный на свободном пропуске молекул растворителя при фильтровании сквозь мембрану и задержке молекул или ионов растворенных веществ, требует тщательной предварительной очистки и умягчения воды.

1.1.3 *Метод отдувки аммиака*. Способ удаления аммиака основан на отдувке из раствора воздухом при рН =11. Сточная вода насосами перекачивается в верхнюю часть охладительной башни и распределяются по загрузке колонны. Нагнетаемый воздух пропускают через загрузку для извлечения аммиака из капель воды. Простота этого процесса делает его наиболее дешевым методом денитрификации в тех случаях, когда предварительно удаляется фосфор путем обработки сточной воды известью. Таким образом, с помощью воздушной отдувки можно добиться 95%-ного удаления аммиачного азота, расходуя 3000 л воздуха на 1 л сточной воды. Практика работы с охладительными башнями вскрыла следующие проблемы:

- на загрузке башен образуются отложения карбоната кальция, которые необходимо часто удалять промывкой кислотами или с помощью механической очистки;
- зимой в башне образуется лед;
- аммиак характеризуется повышенной растворимостью при низких температурах, что снижает эффективность его удаления и может привести к необходимости подогрева башен в зимнее время;
- нитратный азот, образующийся в процессе биологической очистки, не поддается воздушной отдувке.

1.1.4 *Ионный метод.* В отличие от процесса отгонки аммиака, эффективность процесса ионного обмена не зависит от температуры точных вод, поступающих на очистку. К тому же эффективность удаления аммиака при ионообмене значительно выше, и этот процесс заслуживает внимания в тех случаях, когда требуется обеспечить очень низкую концентрацию азота в воде после очистки.

Ионы аммония и нитратов присутствуют в сточных водах в низких концентрациях, и их трудно убрать посредством ионного обмена. Для того, чтобы процесс денитрификации, проводимый путем ионного обмена был экономичным, необходимы материалы, обладающие высокой избирательной способностью по отношению к неорганическому азоту. Чрезвычайно высокой избирательной способностью по отношению к иону аммония обладает клиноптилолит - естественный неорганический цеолитовый материал. Одним из основных условий применения ионообменной очистки сточных вод на неподвижном слое сорбента - содержание взвешенных веществ - 10 мг/л и сульфид-ионов - 8-10 мг/л. Отработанный обменный материал регенерируется с помощью известкового раствора, который затем подвергается отдувке воздухом с выделением аммиака в атмосферу. Исследования показали, что цеолиты целесообразно использовать для доочистки сточных вод при концентрации аммиака в них не выше 100-150 мг/л.

1.1.5 *Электрохимический метод.* Метод основан на электролизе морской воды, в результате которого выделяющаяся гидроокись магния вступает в реакцию с содержащимися в сточных водах ионами фосфора и аммиаком с образованием нерастворимой соли. Установлено, что наиболее эффективная и стабильная очистка с удалением 80-85% аммонийного азота и до 90% ортофосфатов достигается при добавлении в обрабатываемую сточную воду 20% морской воды.

1.2 Последствия употребления загрязненной аммиаком воды

При разовом употреблении солей аммония (200-500 мг / кг массы тела), он приводит к нарушению нервной системы, печени, почек, вызывает отек легких, нарушается метаболизм глюкозы, чувствительность тканей к инсулину. Кратковременное употребление воды с концентрацией солей аммония в пределах 75-360 мг/кг вызывает повышение артериального давления. Любой из этих факторов может оказаться смертельным.

При длительном воздействии на крыс питьевой воды с высоким уровнем аммония наблюдалось снижение содержания кальция в организме, происходила смена в рН крови и уменьшалась вес тела. Вдыхание паров аммиака может сжечь дыхательные пути, привести к токсическому отравлению организма. К тому же при взаимодействии аммонийного азота с активным хлором в процессе хлорирования очищенных сточных вод образуются хлорамины - токсичные и мутагенные соединения.

1.3 Последствия употребления нитритов и нитратов

Вредное воздействие нитратов на организм человека это опасность, заключенная в их способности преобразовываться в нитриты. Именно они по настоящему опасны для организма человека и могут нанести ему

непоправимый вред, как прямой, так и косвенный они имеют сверх высокую токсичность и считаются в 30 раз более опасными, чем нитраты.

1. Нитриты вступают в реакцию с гемоглобином крови, в результате чего образуется метгемоглобин. Это вещество не может переносить кислород, в чем и заключается главная функция крови, результатом нарушения которой является кислородное голодание (гипоксия). Гипоксия вызывает слабость, ухудшение самочувствия, нарушение функций нервной системы, сердца, тканей почек и печени.
2. Самое страшное, что метгемоглобин хуже всего перерабатывается организмом маленьких детей, в особенности до 3-х месячного возраста – ведь механизмы переработки таких веществ в молодом организме еще совершенно не работают. Именно по этому, в мире регистрируется очень много отравлений младенцев, которых кормили питательными смесями, приготовленными из овощей и фруктов или на воде с высоким содержанием нитратов.
3. Так же стоит отметить, что нитраты являются стимулятором развития вредной микрофлоры кишечника. Эта патогенная микрофлора при развитии продуцирует яды, отравляющие организм.
4. Кроме того, нитраты в питьевой воде претерпевают химические превращения, при которых могут образовываться нитросамины - вещества, обладающие высокими канцерогенными свойствами.

Таблица 1. Уровень ПДК в питьевой воде

	ПДК в питьевой воде	Реальный уровень
Нитрит-анион (NO_2^-)	До 1,4 мг/л	До 3,3 мг/л
Нитрат-анион (NO_3^-)	До 44,2 мг/л	До 45 мг/л
Азот аммонийный (NH_4^+)	До 2,6 мг/л	До 7,4 мг/л
Общий азот	2 - 8 мг/л	До 15 -20 мг/л

1.4 Биологическая очистка сточных вод

Метод биологической очистки основан на действии микроорганизмов, которые используют органические загрязнения сточных вод для своей жизнедеятельности: питания и дыхания. В результате действия

микроорганизмов органические вещества окисляются, расщепляются, минерализуются, и таким образом происходит очистка сточных вод.

На первых парах биологическая очистка сточных вод была рассчитана только на удаление органических соединений. Наличие неокисленных органических соединений. Наличие неокисленных органических соединений может быть не только источником неприятных запахов, но также резко изменить кислородный баланс в водоёме, в которой сбрасывается сточная вода. Следствием этого может быть гибель флоры и фауны водоема.

Удаление биогенных элементов путем биологической очистки без применения реагентов является наиболее перспективным: значительно снижаются эксплуатационные расходы на химические реагенты, уменьшается количество образующегося осадка, снижаются транспортные и другие затраты, и в результате происходит снижение химической нагрузки на окружающую среду, так как остатки химических реагентов при сборе очищенных сточных вод не попадают в водоемы и на полигоны складирования.

Позже, больше внимания стало уделяться процессу нитрификации, в результате которого происходит снижение содержания в очищаемой воде азота аммонийного. Аммонийный азот является не только ядом для разнообразной фауны рек, морей и океанов, но и биогенным элементом, который может вызвать интенсивную эвтрофикацию водоема. Кроме того, автотрофные микроорганизмы, окисляя азот аммонийный, понижают концентрацию растворенного кислорода в водоемах.

Биологическая очистка может происходить как в присутствии растворенного кислорода, так и в его отсутствии. В связи с этим процессы соответственно разделяются на аэробные и анаэробные. Для очистки хозяйственно-бытовых сточных вод в основном применяются аэробные процессы. Анаэробная обработка используется для очистки сильнозагрязненных (промышленных) сточных вод.

Достоинствами биологической очистки являются:

- Возможность удаления из стоков широкого спектра органических и неорганических веществ;
- Простота используемой аппаратуры;
- Относительно невысокие эксплуатационные расходы;
- Бесконечная реакция.

Биологическая очистка стоков производится в различных по конструкции сооружениях - биофильтрах, аэротенках, (с активным илом) и метатенках (аэробное брожение).

Для технической реализации процесса важными являются следующие заключения:

- при биологической очистке значительная часть загрязнений, содержащихся в сточной воде, трансформируется в биомассу, сравнительно легко отделимую от очищенной воды;
- длительность изъятия и окисления содержащихся в сточной воде органических загрязнений будет тем короче, чем больше будет масса микроорганизмов в контакте с ними;
- при падении содержания органических веществ в очищаемой жидкости ниже определенного предела жизнедеятельность микроорганизмов продолжается, но уже либо за счет накопленных питательных веществ, либо за счет их собственной биомассы, т.е. отмирания и окисления микроорганизмов со снижением их общей массы (процесс самоокисления).

Необходимый возраст микробиальной культуры, ее высокая метаболическая активность и хорошая седиментационная способность достигаются поддержанием лишь необходимого количества биомассы в аэрационном сооружении за счет выделения из него ее прироста и обеспечением соответствующей длительности контакта биомассы с загрязнителями.

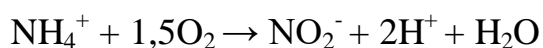
1.5 Процессы нитрификации

В сточных водах азот представлен в основном в виде минеральной (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+) и органической составляющей (аминокислоты, белок тканей организмов, органические соединения). Методами химического анализа определяются четыре формы: азот аммонийный, нитраты, нитриты, азот общий. Превращение аммиака (катиона аммония) в нитрат - нитрификация как в почве, так и в воде осуществляется нитрифицирующими бактериями. Однако нет такой бактерии, которая бы прямо превращала аммиак в нитрат. В его окислении всегда участвуют две группы бактерий: одни окисляют аммиак, образуя нитрит, а другие окисляют нитрит в нитрат.

Первую стадию нитрификации - окисление аммонийного азота до нитритов - осуществляют бактерии pp. *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrovibrio*. Вторую - окисление нитритов до нитратов - бактерии pp, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*.

Причем, бактерии, окисляющие аммиак, поставляют субстрат для бактерий, окисляющих нитрит.

Бактерии, окисляющие аммиак
нитрит:



Бактерии, окисляющие:



Nitrosomonas europaea

Nitrobacter winogradskyi

Nitrococcus oceanus

Nitrobacter agilis

Nitrosolobus multiformis

Nitrobacter gracilis

Nitrobacter mobilis

Процессы нитрификации первой стадии зависят от температуры сточной жидкости. При температуре 9°C снижается скорость нитрификации (8°C - минимальная допустима); при температуре +6°C процесс нитрификации прекращается полностью, при температуре 37°C скорость нитрификации также снижается в связи с уменьшением в воде растворенного кислорода. В диапазоне температур от 15 до 35°C нитрификация удовлетворительна и ее интенсивность нарастает с повышением температуры. При прочих благоприятных для нитрификации условиях, в зимнее время, её активность снижается на 10%.

В качестве окисляемого субстрата бактерии способны использовать аммиак, мочевины, мочевую кислоту, гуанин. При этом органическую часть молекулы бактерии не потребляют. Всю энергию, необходимую для процессов жизнедеятельности, бактерии получают, окисляя соли аммония, которые выступают при этом донором водорода. Также их часть поглощается бактериями в пищу. Эта стадия нитрификации заключается в окислении образовавшихся в первой фазе солей азотистой кислоты в соли азотной кислоты. Единственным субстратом окисления для них являются нитраты. Бактерии второй стадии ещё более чувствительны к неблагоприятным условиям среды, содержащую растворенного кислорода, рН. Однако бактерии второй стадии нитрификации менее чувствительны к токсинам и воспроизводятся гораздо быстрее, чем бактерии, обеспечивающие первую стадию. Поэтому первая нитрификации чаще бывает лимитирующей.

Вторая стадия нитрификации - образование нитратов, начинается при успешном завершении первой, поскольку избыток аммиака тормозит развитие возбудителей второй стадии нитрификации.

При окислении теоретический выход биомассы *Nitrosomonas* первой стадии составляет 0,147 мг на 1 мг окисленного азота, а *Nitrobacter* второй стадии - 0,02 мг на 1 мг азота.

Всего кислорода на нитрификацию расходуется на 1 стадию - 3,15 мг на 1 мг азота, на 2 стадию - 1,11 мг на 1 мг азота; общее потребление кислорода - 4,26 мг на 1 мг азота.

Описание процесса превращения азота позволяет идентифицировать критические фактора для хода нитрификации на действующих сооружениях биологической очистки. К таким факторам относятся:

- температура очищаемой воды (допустимая 9 - 35°C, оптимальная 15 - 30°C);
- содержание водорастворимой легкоокисляемой органики в очищаемых сточных водах и эффективности её окисления;
- аэробность в аэротенках, вторичных отстойниках (минимальное содержание растворенного кислорода больше 10 мг/дм³, оптимальная для первой фазы 1,8 - 3,0 мг/дм³, для второй 2,5 - 3,5).
- состав и относительное содержание промышленных сбросов в сточных водах, присутствие в них токсических веществ (ТМе менее 5 мг/дм³ без учета их сочетающего действия);
- величина нагрузки на активный ил, возраст ила (оптимальный 6 - 9 суток) и численность нитрифицирующих бактерий;
- период аэрации в аэротенке и процесс регенерации активного ила;
- допустимая рН 5,6 - 10,3. Оптимум для первой фазы 7,2 - 8,6; для второй - 7,0 - 7,6.

Выявление и определение численности нитрификаторов осуществляют высевом анализируемой суспензии в селективную минеральную среду Виноградского. Единственный источник углерода в среде - двуокись углерода, присутствующая в воздухе и входящая в состав мела. Энергетическим материалом и источником азота для возбудителей первой стадии нитрификации служат аммиак и соли аммония, для возбудителей второй - нитрит, образующийся при окислении NH_4^+ . Необходимым условием развития нитрификаторов является широкий доступ кислорода к культуре. Численность нитрификаторов определяют используя метод предельных разведений.

2. Теоретический анализ

В ходе биологической очистки сточных вод лежит биохимическое окисление органических загрязнений микроорганизмами в аэробных или анаэробных условиях. Участвуя в конструктивном и метаболическом обмене живой клетки, органические вещества сточных вод претерпевают сложные химические и биологические превращения. В результате катаболизма происходит распад этих веществ с образованием более простых органических низкомолекулярных соединений, часть которых подвергается дальнейшему окислению до CO_2 и H_2O с выделением энергии или превращением в продукты метаболизма, а другая часть используется для биосинтеза в процессах анаболизма.

Одним из главных процессов, проходящих в ходе биологической очистки, является нитрификация — двухстадийный процесс последовательного окисления аммонийного азота до нитритов, нитритов — в нитраты, а затем нитратов и часть нитритов до азота.

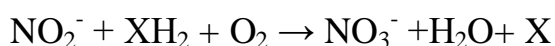
На первом этапе окисления аммиака или аммония до нитрита, один атом кислорода непосредственно включается в субстрат с образованием гидроксиламина:



Реакция катализируется монооксигеназой (оксидазой смешанных функций). Окисление аммония до гидроксиламина сопровождается переносом двух электронов по электротранспортной цепи с участием тех же ферментов, что и при дыхании.

Образующийся гидроксиламин является источником энергии и на последующих этапах окисления также окисляется с участием ферментов электротранспортной цепи. При этом в качестве промежуточных продуктов предположительно образуются гипонитрит ион NOH и оксид азота NO . Акцептором электронов, освобождающихся при окислении NH_2OH , является цитохром. При образовании нитрита молекулярный кислород -обязательный конечный акцептор электронов.

Окисление нитрита до нитрата сопровождается переносом электронов по электротранспортной цепи на O_2 в качестве конечного акцептора. При окислении нитрита до нитрата микроорганизмами *Nitrobacter* кислород выступает как терминальный акцептор электрона в реакции, в которой атом кислорода включается в нитрат из воды, а не из O_2 :



Затем на последнем этапе под действием уже других микроорганизмов нитраты и часть нитритов восстанавливаются до чистого азота N_2 . Далее

барботажем (продувкой) воздуха азот вытесняют из воды, где дальше он усваивается растениями или используется в деятельности человека.

Нитрификация с последующей денитрификацией - наиболее легкий и экономически доступный способ удаления неорганического азота из сточных вод.

Автотрофная нитрификация может осуществляться в любых аэрируемых сооружениях биологической очистки: в аэротентах, на биофильтрах и биодисках, в сооружениях с псевдодвижущимся слоем.

3. Цели и задачи исследования

Недостатки, существующие в нынешнем методе очистки, а именно требование постоянного барбатирования кислородом воздуха, что приводит к большим энергозатратам, и ставят *цель моего исследования*, а именно:

выделить колонии микроорганизмов, которые способны были окислять аммонийный азот до нитратов (и нитритов), для дальнейшего восстановления до азота или получения азотных удобрений.

Задачи исследования:

1. Выделение сообщества бактерий и исследование основных свойств этих микроорганизмов.
2. Исследование условий роста выделенных микроорганизмов.
3. Изучение способности выделенных микроорганизмов потреблять азот аммонийный.

4. Методы исследования

4.1 Методика определения концентрации азота аммонийного в растворе.

Методика предназначена для измерения содержания массовой концентрации ионов аммония от 0,05 - 4,0 мг/дм³ в природных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Несслера.

Если массовая концентрация ионов аммония в анализируемой пробе превышает верхнюю границу, то допускается разбавление пробы таким образом, чтобы концентрация ионов аммония соответствовала регламентированному диапазону.

Мешающие влияния, обусловленные присутствием аминов, хлорамина, ацетона, альдегидов, спиртов, фенолов, компонентов жесткости воды, взвешенных веществ, железа, сульфидов, хлора, гуминовых веществ, устраняются специальной подготовкой пробы к анализу.

Принцип метода

Фотометрический метод определения массовой концентрации ионов аммония основан на взаимодействии NH_4^+ -ионов с тетраиодомеркуратом калия в щелочной среде $\text{K}_2\text{HgI}_4 + \text{KOH}$ (реактив Несслера) с образованием коричневой, нерастворимой в воде соли основания Миллона $[\text{Hg}_2\text{N}]^*\text{H}_2\text{O}$, переходящей в коллоидную форму при малых содержаниях NH_4^+ -ионов. Светопоглощение раствора измеряют при длине волны равной 425 нм в кюветках с длиной поглощающего слоя 1 или 5 см. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации NH_4^+ - ионов в растворе пробы.

Мешающие факторы

Определению аммонийного азота с реактивом Несслера мешают соединения с несколькими амидными группами, алифатические и ароматические амины, спирты, альдегиды, ацетон, хлорамины и другие органические соединения, реагирующие с реактивом Несслера. В их присутствии аммонийный азот отгоняют из анализируемой воды и определяют его в полученном дистилляте.

Определению мешают соли жесткости, железо, сульфидов, свободный хлор, мутность воды.

Приборы и реактивы

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Аммоний хлористый.
3. Вода дистиллированная.
4. Калий-натрий виннокислый 4-водный (Сегнетова соль).
5. Реактив Несслера.

Приготовление растворов для анализа

Приготовление основного раствора хлористого аммония

2,965 г аммония хлористого помещают в стакан, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 1000см³, а затем доводят до метки.

1см³ раствора содержит 1 мг NH₄⁺. Приготовленный раствор хранят в банке и темного стекла в течение года.

Приготовление рабочего раствора хлористого аммония

Раствор готовят в день проведения анализа, разбавлением основного стандартного раствора безаммиачной водой.

1см³ раствора содержит 0,005 мг NH₄⁺.

1 см³ раствора должен содержать 0,005 мг NH₄⁺.

Приготовление раствора калия-натрия виннокислого (Сегнетова соль).

50 г KNaC₄H₄O₆*H₂O помещают в стакан, растворяют в небольшом количестве безаммиачной воды, переносят в мерную колбу на 100см³, доводят до метки бидистиллированной водой, прибавляют 0,2 - 0,5 см³ реактива Несслера. Раствор можно применять после осветления

Проведение анализа

К 50 см³ пробы, или к её меньшему объему, доведенному до 50 см³ безаммиачной водой, прибавляют 1-2 капли раствора сегнетовой соли и смесь тщательно перемешивают. При анализе очень жестких вод количество добавляемого раствора сегнетовой соли увеличивается до 0,5-1,0 см³. Затем добавляют 1 см³ реактива Несслера и вновь перемешивают. Через 10 минут измеряют оптическую плотность. Окраска смеси устойчива в течение 30 минут. Из величин оптической плотности вычитают оптическую плотность холостого опыта.

Построение калибровочного графика

В мерные колбы вместимостью 50 см³ по 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; ... 40 см³ рабочего стандартного раствора аммония, доводят до метки безаммиачной водой. Полученную шкалу растворов с содержанием 0,0; 0,025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; ... 0,2 мг NH₄⁺ обрабатывают описанным выше способом.

По полученным значениям оптической плотности строят градуировочный график (длина волны 400 нм), откладывая на оси абсцисс введенные массы аммонийного азота в миллиграммах, а на оси ординат - соответствующие им значения оптических плотностей, вводят поправку на холостой опыт.

Для растворов с содержанием 0,0 - 0,03 мг ионов аммония строят график, используя кюветы толщиной слоя 5 см; для растворов, содержащих 0,03 - 0,2 мг NH_4^+ - график с использованием кюветы с толщиной слоя 1 см.

Обработка результатов измерения

Содержание ионов NH_4^+ в мг/дм³ вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V}{n}$$

Где С - содержание ионов аммония, найденное по калибровочному графику, мг,

V - объем пробы, взятой для анализа, см³,

n=1 при прямом определении ионов аммония.

За результатом анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, относительное расхождение между которыми не превышает допустимое расхождение, равное 5% при доверительной вероятности P=0,95.

4.2 Фотометрическое определение нитритов с реактивом Грисса

Принцип метода

Метод основан на диазотировании сульфаниловой кислоты нитрит ионами и последующем взаимодействии полученной соли с α -нафталином с образованием азокрасителя, окрашенного в розовый цвет. Реакция протекает в кислотной среде.

Реактивы:

Реактив Грисса. Применяют сухой реактив, тщательно растертый в ступке до однородной массы.

Стандартные растворы нитрита натрия

1. Основной раствор

Растворить 0,497 г нитрита натрия дистиллированной водой в мерной колбе на 1 литр (1 мл раствора содержит 0,1 мг азота нитритов)

2. Рабочий раствор

Готовят разбавлением основного раствора в 100 раз дистиллированной водой (1 мл раствора содержит 0,001 мг азота нитритов)

Калибровочный график

Для приготовления серии стандартных растворов в мерные колбы вместимостью 50 мл вносят 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; мл рабочего раствора добавляют около 0,1 г сухого реактива Грисса (на кончике шпателя),

тщательно перемешивают и доводят объемы растворов до метки дистиллированной водой. Концентрации полученных растворов соответственно равны 0; 0,0002; 0,0005; 0,001; 0,002; 0,004; 0,005 мг азота нитритов. Через 40 минут измеряют оптическую плотность каждого раствора на ФЭКе с зеленым светофильтром длинна волны 540 нм, используя в качестве раствора сравнения холостой опыт. Строят калибровочный график в координатах: оптическая плотность - концентрация азота нитритов в мг.

Ход определения

В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 10-40 мл профильтрованного через "синяя лента" пробы, содержащей 0,0002 - 0,0005 мг азота нитритов, прибавляют 0,1 г сухого реактива Грисса, тщательно перемешивают и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Через 40 минут фотометрируют, как при построении калибровочного графика. Концентрацию нитритов в определяемом объеме находят по калибровочному графику.

Расчет

Содержание азота нитритов (X) в мг/л рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_0}{V}$$

где C - концентрация азота нитритов, найденная по калибровочному графику во взятом для анализа объеме воды, мг;

V - объем исследуемой пробы, мл.

Коэффициент пересчета азота нитритов на нитрат ионы - 3,285.

Диапазон 0,005 - 0,1 мг, округление 0,001 мг.

Диапазон 0,1 - 0,5 мг, округление 0,01.

4.3 Колориметрическое определение нитратов с применением салицилата натрия

Принцип метода

В среде концентрированной серной кислоты нитрат - ионы реагируют с салицилатом натрия, образуя смесь 3-нитросалициловой и 5-нитросалициловой кислот, соли которых в щелочной среде имеют желтую окраску. Без разбавления можно определить нитрат - ионы в концентрациях от 0,1 до 20 мг/л.

Мешают определению окрашенные органические вещества. Их можно предварительно удалить обработкой пробы суспензией гидроокиси алюминия. Если же окрашенные вещества образуются под действием серной кислоты на остаток после выпаривания (см. ход определения), то этот метод определения нитратов применять нельзя.

Хлориды в концентрациях, превышающих 200 мг/л, мешают определению. Их можно удалить обработкой пробы сульфатом серебра, но в большинстве случаев высокая чувствительность метода допускает устранение мешающего влияния хлоридов простым разбавлением пробы.

Железо мешает в концентрациях, превышающих 5 мг/л. Его можно предварительно отделить (а так же и большинство тяжелых металлов) обработкой гидроокисью алюминия.

Нитриты не мешают, если концентрация их не превышает 1-2 мг/л. При содержании нитрит - ионов в концентрации 20 мг/л результат определения нитрат - ионов получается повышенным на 1 мг/л. Если нитрит - ионов больше 2 мг/л, рекомендуется удалить их выпариванием на водяной бане с добавлением 0,05 г сульфата аммония.

Реактивы

Салицилат натрия, 0,5%-ный раствор, всегда свежеприготовленный. Растворяют 0,5 г соли в 100 мл дистиллированной воды.

Серная кислота, 1,84 г/см³, не должна содержать нитратов.

Едкий натр и сегнетова соль, раствор. Растворяют 400 г едкого натра, высушенного при 105°C, в дистиллированной воде и после охлаждения разбавляют до 1 л.

Нитрат калия.

Основной раствор. Растворяют 0,1631 г KNO₃, высушенного при 105°C, в дистиллированной воде, прибавляют 1 мл хлороформа и разбавляют водой до 1 л; в 1 мл этого раствора содержится 0,100 мг NO₃⁻.

Рабочий раствор. Разбавляют 10 мл приготовленного раствора дистиллированной водой до 100 мл. 1 мл полученного раствора содержит 0,01 мг NO₃⁻. Применяют только свежеприготовленный раствор.

Ход определения

К 20 мл первоначальной пробы прибавляют 2 мл раствора салицилата натрия и выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане досуха. После охлаждения сухой остаток смачивают 2 мл серной кислоты и оставляют на 10 минут. Затем содержимое разбавляют 15 мл дистиллированной воды, приливают 15 мл раствора едкого натра и сегнетовой соли, переносят количество в мерную колбу с емкостью 50 мл, обмывая стенки чашки дистиллированной водой, охлаждают до комнатной температуры, доводят дистиллированной водой до метки и полученный окрашенный раствор колориметрируют, применяя фиолетовые светофильтры, длина волны 410 нм и кюветы с толщиной слоя 5 см. В течение 10 минут после прибавления раствора едкого натра окраска не изменяется. Результат определения находят по калибровочной кривой, для приготовления которой отбирают 0; 0,5; 1,0; 20 мл рабочего стандартного раствора нитрата калия, доводят дистиллированной водой до 20 мл, проводят определение, как

описано выше, и строят калибровочный график в координатах: оптическая плотность - концентрация нитрат ионов.

Расчет

Содержание нитратов (X) в мг/л рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V}{V_0}$$

где C - концентрация азота нитратов, найденная по калибровочному графику во взятом для анализа объеме воды, мг.

V - объем исследуемой пробы воды, мг.

4.4 Метод выделения микроорганизмов

Потребности в элементах питания, продукты обмена веществ и другие особенности микроорганизмов можно исследовать только при работе с чистыми культурами. Чистой культурой микроорганизмов называют культуру, полученную из одной клетки. Выделению чистой культуры как правило, предшествует получение накопительной культуры, т.е. культуры, обогащенной микроорганизмами с желаемыми свойствами. Накопительные культуры получают с помощью создания селективных условий.

4.4.1 Приготовление жидкой питательной среды.

Готовят 350 мл среды Виноградского следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0; K_2HPO_4 - 1,0; MgSO_4 - 0,5; FeSO_4 - 0,4 ; NaCl - 2,0; вода водопроводная и разливают ее в колбы по 5 мл в каждую. высота слоя среды в колбах должна быть 1-1,5 см. В каждую колбу вносят на кончике шпателя небольшое количество мела.

Затем вносят в жидкую питательную среду Виноградского посевной материал. одну колбу со средой оставляют стерильной (контроль).

4.4.2 Культивирование.

Культивирование проводят при температуре 28 - 30°C, продолжительность культивирования — 1-2 недели. При этом необходимо наблюдать за внешними признаками роста культуры:

- помутнение
- выпадение осадка
- изменение цвета
- образование кольца на стенках сосуда
- газообразование

4.4.3 Посев на питательную среду и получение чистой культуры.

Посев на плотные питательные среды МПА делается с целью получения отдельных, изолированных колоний. Посев делается на чашки Петри по методу Коха (метод посева со шпателем Дрегалевского). В первую чашку втираем 100 мкл культуральной жидкости (объем вводимой культуральной жидкости зависит от концентрации микроорганизмов в ней) с помощью дозатора и наконечника. Затем все растирается стерильным шпателем Дрегалевского по пяти чашкам. Необходимо взять тот вид, который представлен большим количеством колонии и более активным ростом. Выделяем этот вид с помощью пересева на "косяки". Подхватываем петлей в стерильных условиях биомассу и садим на "косяк". Таким образом, каждый вид находится на "косяке". Затем путем пересева с "косяка" на "косяк" проверяем чистоту культуры.

4.4.4 Диско - диффузионный метод.

Диско - диффузионный метод позволяет определять чувствительность микроорганизмов к каким либо веществам. Имеется зависимость между степенью чувствительности микроорганизмов к какому либо веществу и размером зоны угнетения. По степени чувствительности выделяют микроорганизмы:

- высокочувствительные
- чувствительные
- малочувствительные
- устойчивые.

В случае, если в зоне угнетения вырастают колонии испытываемого вида микроорганизмов, это означает, что испытываемый вид устойчив к исследуемому веществу.

Исследуемым веществом пропитывается бумажный диск, который наносится на поверхность плотной питательной среды. Вещество диффундирует в агар, формируя вокруг диска зону угнетения микроорганизмов. Процесс диффузии заканчивается через 3-4 часа после нанесения диска на поверхность плотной питательной среды. Наибольшая концентрация исследуемого вещества находится в месте расположения диска, по направлению к периферии концентрация его снижается. Микроорганизмы или бактерии, чувствительные к веществу, образуют вокруг дисков зоны угнетения роста, четко выделяющиеся на фоне сплошного бактериального роста. Величина зоны угнетения определяет степень чувствительности к веществу. Измерение зоны угнетения производится с помощью циркуля или миллиметровой линейки. Измеряемый диаметр зоны угнетения должен проходить через центр диска. В некоторых случаях зона угнетения имеет овальную форму. В таких случаях измеряют наибольший и наименьший диаметр зоны и вычисляют среднюю величину, которую и принимают за показатель.

4.4.5 Метод изучения роста культуры в жидкой питательной среде.

1. Выделить культуру с какими либо специфическими свойствами, интересными для исследователя.
2. Наблюдать за внешними изменениями, происходящими в жидкости, если микроорганизмы - анаэробы, исключить доступ кислорода. Изменения фиксировать 1-2 раза в неделю.
3. Сделать посев культуральной жидкости на плотные питательные среды с целью получения изолированной колонии или накопительной культуры (с использованием метода Коха).
4. Описать колонию, их морфологию.
5. Из накопительной культуры, если она представлена несколькими видами, нужно выделить ту культуру, которая представлена большим количеством колоний.
6. Пересеять на "косяки" с целью разделения разных видов друг от друга. Культуру необходимо идентифицировать.
7. Если уже имеется выделенная культура, необходимо ее омолодить - провести культивирование на жидкой питательной среде.
8. Провести культивирование - ставим на качалку.
9. Через 30 минут культивирования стерильно отлить культуральную жидкость из колбы для измерения оптической плотности и для анализа определяемого вещества/элемента. Содержимое колбы перемешать и только тогда слить для определения оптической плотности и концентрации вещества (длина волны 670 нм, диаметр кюветы 5 мм).
10. Отцентрифугировать. В пробирки для центрифугирования наливается не больше 2/3 объема пробирки.
11. Далее измерения проводятся каждый час.
12. Строим график зависимости оптической плотности культуральной жидкости, концентрации вещества от времени культивирования.

5. Экспериментальная часть

5.1 Выделение микроорганизмов из почвы и воды

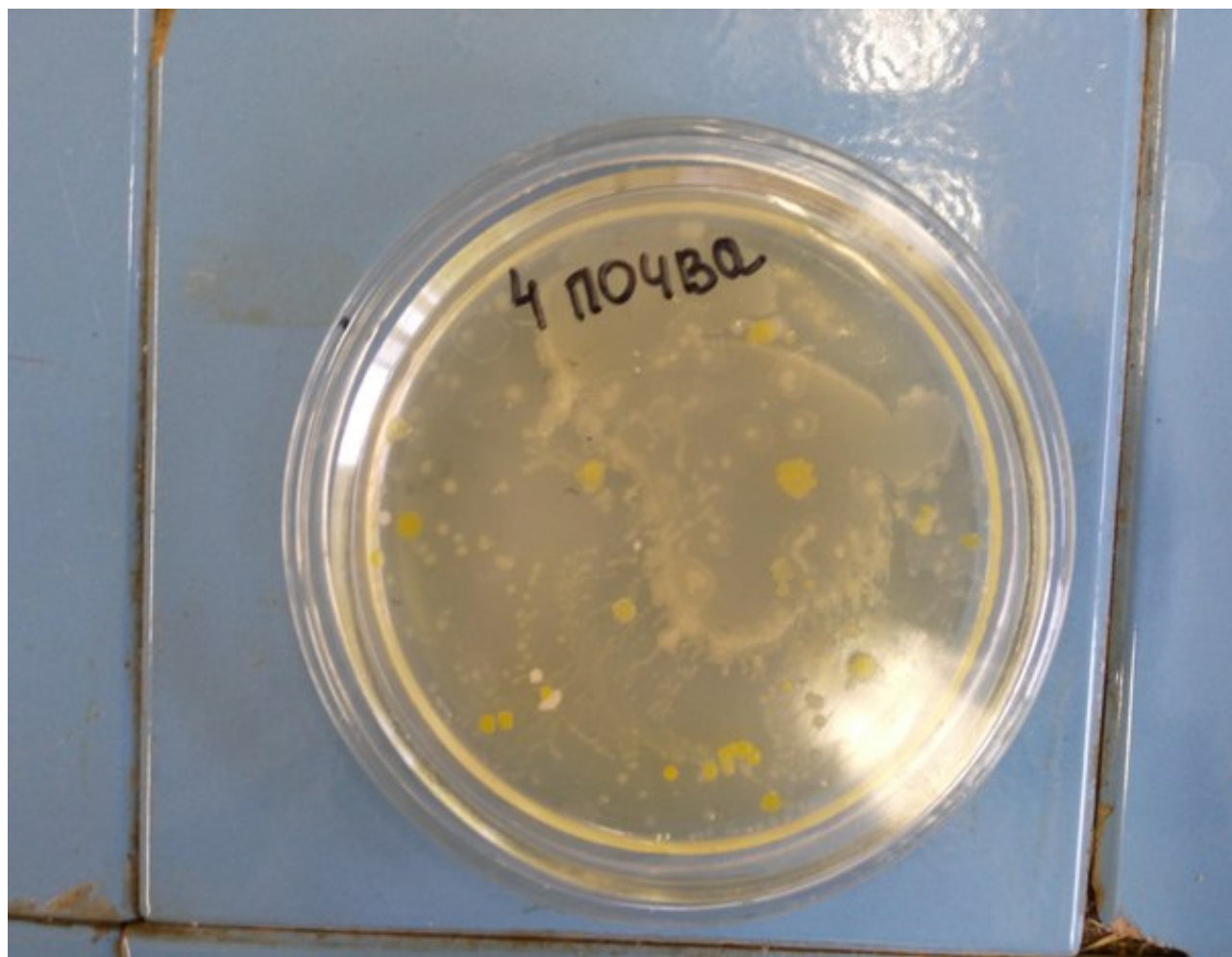
При культивировании микроорганизмов была специально взята вода и почва из хозяйственных и бытовых сточных вод г. Перми, чтобы выведенные микроорганизмы были жизнеспособны к присутствию аммиачного азота. Непосредственно культивирование проводилось на качательной мешалке в колбах Эрленмейра объёмом 25 дм³ в 10 дм³ среды Виноградского в течении 9 дней при температуре 28°C. Наблюдался рост бактерий, о чем свидетельствует помутнение культуральной жидкости и образование кольца на стенках сосудов уже на 4 день.

5.2 Выделение чистой культуры

Внесли 100 мкл из почвы и земли на питательную среду МПА в чашки Петри. В обоих случаях получился "газон". Путем выделения доминирующей группы бактерий и переноса их в отдельные чашки Петри, к 4 разу получилось выделить чистую культуру как из почвы, так и из воды. Далее их переселили на косяки с целью дальнейшей идентификации и анализу свойств.

Рисунок 1. Полученная чистая колония из почвы





5.3 Идентификация микроорганизмов

Идентификация проводилась на микроскопе под увеличением в 10,000 раз. Бактерии, полученные из почвы (1 вид) и воды (2 вид), были идентифицированы как *Nitrosomonas europaea* и *Nitrobacter mobilis* по характерным им свойствам. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Описание выделенных микроорганизмов

Характеристика	1 вид	2 вид
Форма колоний	Круглая	Ризоидная
Размер	1-2 мм	4 мм
Оптические свойства	Блестящая	Полупрозрачная
Цвет	Молочно - белый	Желтый
Поверхность	Гладкая	Гладкая
Профиль	Выпуклый	Кратерообразный
Край колоний	Гладкий	Волнистый

Структура колоний	Однородная	Волокнистая
Консистенция	Маслянистая	Маслянистая

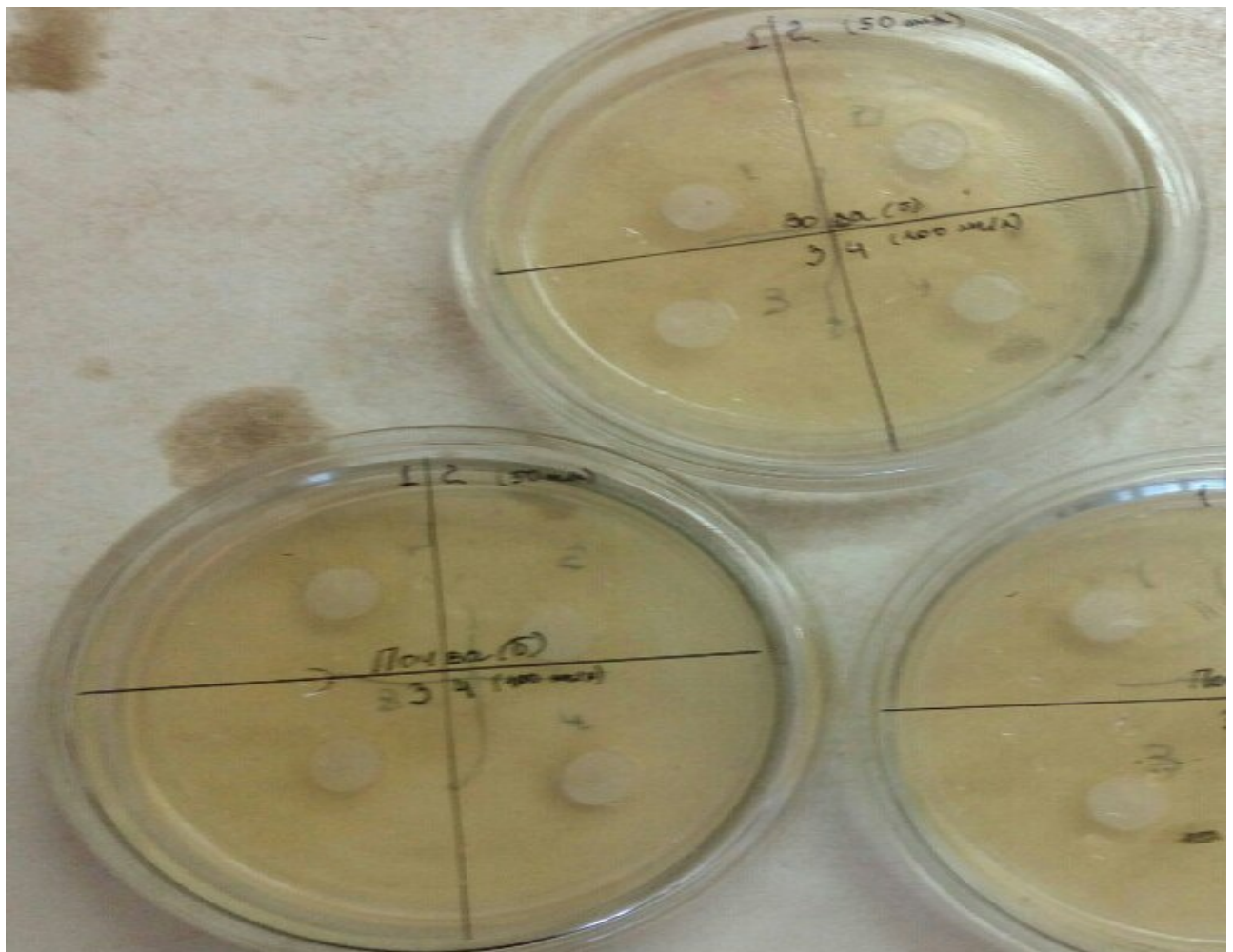
5.4 Проверка выделенных микроорганизмов на толерантность диско - диффузионным методом

Произведена проверка бактерицидно-бактериостатической устойчивости полученной культуры к соли аммония (NH_4Cl) диско-диффузионным методом. Были испытаны концентрации NH_4Cl объёмом 50 и 100 мг/л. Рисунок 3. На дно чашки Петри были нанесены выделенные микроорганизмы из воды и почвы.

Дно чашки было разделено на 4 сектора хлорида аммония: 1 - 50 мг/л; 2 - 50 мг/л; 3 - 100 мг/л; 4 - 100 мг/л. В каждый сектор был помещен пропитанный солью кружок бумаги: об устойчивости данной культуры данной культуры к солям можно было судить по образованию так называемой зоны отчуждения.

Было выяснено, что при концентрации азота аммонийного до 100 мг/л исследуемые виды микроорганизмов не испытывают угнетения, напротив в этой зоне выросли колонии двух видов микроорганизмов. Это означает, что данные клетки устойчивы к ионам аммония.

Рисунок 3. Диско-диффузионный метод



5.5 Испытание выделенных микроорганизмов в процессе нитрификации

Изучена способность выделения из воды и из почвы нитрифицирующих микроорганизмов потреблять аммонийный азот. Эксперимент проводился в статических условиях в среде Виноградского, в двух повторностях. Исходная концентрация ионов аммония в растворе составила 60 мг/л. Объем раствора 100 мл, pH = 3,6. Для этого опыта были взяты бактерии, полученные из воды, так как в ходе предыдущего эксперимента они показали более лучшие результаты, чем бактерии, полученные из почвы.

Для определения остаточных концентраций азота аммонийного, нитрат-ионов и нитрит-ионов были построены калибровочные графики.

Изменение концентрации NO_2^- и NO_3^- в растворе фиксировали по мере роста микроорганизмов.

Время в часах	0	20	24	40
$\text{C}(\text{NH}_4^+)$ в мг/л	60,1	43	39,5	37
	60,1	39	37,816	36
$\text{C}(\text{NO}_2^-)$ в мг/л	0,013	0,031	0,063	0,090
	0,0125	0,0304	0,064	0,093
$\text{C}(\text{NO}_3^-)$ в мг/л	3,3	3,4	3,8	3,95
	3,3	3,7	3,85	4

Как следует из полученных данных, концентрация аммонийного азота понизилась в 1,7 раз за 40 часов (см. табл. 3) культивирования микроорганизмов. При этом концентрация нитрит и нитрат-ионов, выделенных в раствор, невелика. Отсюда следует, что нитрифицирующие микроорганизмы не только окисляют аммонийный азот с образованием нитритов и нитратов, но и поглощают его в процессе наращивания биомассы в качестве источника питания. Высокое количество аммонийного азота в растворе объясняется небольшим временем культивирования (для нитрификаторов необходимо от 5 до 10 суток).

Таблица 3. Изменение концентрации азота аммонийного нитрат и нитрит-ионов.

6.Выводы

1. Проведен анализ научно-технической информации по способам очистки сточных вод от биогенных элементов. Определены основные направления работы - выделение культуры микроорганизмов, обладающих способностью к потреблению ионов аммония и изучению механизма этого процесса.
2. Выделены два вида микроорганизмов из сточной воды и почвы г. Перми Дзержинского, района и изучены морфологические свойства.
3. Определена толерантность полученных микроорганизмов по отношению к катионам аммония диско-диффузионным методом. Показано, что при концентрациях азота аммонийного до 100 мг/л исследуемые виды микроорганизмов не испытывают угнетения.
4. Изучена способность выделенных из воды нитрифицирующих микроорганизмов потреблять аммонийный азот. Культивирование проводилось 40 часов. Показано, что при этом концентрация аммонийного азота уменьшилась в 1,7 раза.

Список литературы

1. Скворцов Л.С., Коныгин А.А., Шматова А.А. Современные технологии очистки сточных вод и эколого-экономическая оценка их использования. // Экология и промышленность России. 2012-15. - №5. - С. 4-8.
2. Черногорова А.Е., Сухарев Ю.И., Багриновцева Е.О. Бисорбционные явления на глауконите при нитрификации в процессе очистки сточных вод активным илом. // Известия Челябинского научного центра. - 2010.
3. Лобанов С. А. Технология выделения и утилизации аммонийного азота из сточных вод химических предприятий: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. техн. наук. - Пермь, 2007. - 19 с.
4. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками: монография. - 3-е изд. - М.: АКВАРОС, 2003-16. - С. 188-214.
5. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии . Учебное пособие для студентов. - М.: Мир, 2006. - С.169-170,230-233, 430-437.
6. Микроорганизмы как новый способ переработки опасных соединений Романенко. Л, Лаврина М.
7. Биотехнология. Под ред. А.А.Балева. М., 1988

Электронные ресурсы:

8. Вред нитритов и нитратов. <https://mydozimetr.ru/articles/nitraty>
9. Урон, наносимый азотом аммонийным. <https://www.botanichka.ru/article/azotnyie-udobreniya/>
10. Новейшие способы очистки воды от азота аммонийного. <http://www.findpatent.ru/patent/213/2136612.html>
11. Методики выведения и распознавания бактерий. https://studopedia.ru/10_133207_metodi-obnaruzheniya-bakteriy-i-opredeleniya-ih-chislennosti.html
12. Определения концентрации веществ с помощью фотометрического метода. http://studbooks.net/1924184/matematika_himiya_fizika/fotometricheskie_metody_opredeleniya_kontsentratsii_veschestva_rastvore